

耐塩性酵母の生成する揮発性成分量と培養期間との関係

石原 和夫, 本間 伸夫

Relation between Volatile Component Contents Produced by Halotolerant Yeasts and Incubation Period

Kazuo Ishihara, Nobuo Honma,

緒 言

本間¹⁾²⁾, 望月³⁾らによる無菌味噌の考案は味噌熟成に関与する麹菌以外の微生物の役割の解明を可能にし、多くの成果が得られた。その結果、味噌の熟成過程において味噌らしい香気付与あるいは矯正に耐塩性酵母群の存在が不可欠であることがわかった⁴⁾⁵⁾。しかし、その耐塩性酵母群の香気付与のメカニズムはいまだ詳細には解明されていない。

耐塩性酵母群による香気付与のメカニズム究明の方法としては、安平⁶⁾らによる仕込み時に酵母を添加し熟成された味噌の香気を研究する方法、望月⁴⁾や著者⁷⁾らによる無菌味噌と普通味噌の比較による研究の方法がある。しかしながら、これらの方法では原料よりの麹菌酵素や酵母以外の微生物、また非生物的化学反応により香気が生成されるため解析を複雑にしている。そこで、これらの方法に加えて合成培地の使用などにより耐塩性酵母群の香気付与のメカニズムの究明も必要と考えられる。合成培地使用による研究は、安平⁸⁾らによるアルコール類、森⁹⁾らによる有機酸類の報告があるがいまだ系統的な研究はみあたらない。耐塩性酵母群の生成する香気成分の究明にあたり、培養期間にともなう経時変化を調べる場合は別として、ある1時点をとりあげ論ずる場合は菌株間の生育度の違いなど考慮せずに培養期間を決定するには問題がある。本報では耐塩性酵母により生成される主なる揮発性成分量の経時変化を調べ、最適な培養期間を求めることを試みたのでその結果を報告する。

実験材料および方法

1. 供 試 菌 株

1) *Saccharomyces rouxii* S84¹⁰⁾ (以下S. *rouxii*)

2) *Torulopsis versatilis* D-5¹¹⁾¹²⁾ (以下T. *versatilis*)

いずれも分離源が赤色辛口味噌であり、新潟県食品研究所より分譲いただいたものである。

2. 培地および培養方法

保存培地, 前培養培地, 本培養培地の組成を表1に示した。

表1 培 地 組 成

保存培地 (/l)		本 培 養 培 地		(/l)	
Glucose	50g	Glucose	20g	Biotin	0.002mg
Law soy souce	100ml	Amino acids mixture* (as N)	0.4g	Ca-pantothenate	0.4mg
NaCl	83g			Inositol	2.0mg
pH 5.3		KH ₂ PO ₄	2g	Nicotinamide	0.4mg
Agar	22g	CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.1g	p-aminobenzoic acid	0.2mg
前培養培地 (/l)		MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	Pyridoxine HCl	0.4mg
Glucose	50g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	10mg	Thiamine HCl	0.4mg
Law soy souce	100ml	MnSO ₄ · 7H ₂ O	10mg	Riboflavine	0.2mg
NaCl	125g	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	10mg	NaCl	125g
pH 4.5				pH 4.5	

* 大豆アミノ酸組成に準ずる

前培養はガラス製遠沈管を利用し, 保存培養したものより数白金耳接種し, 30℃で3日間静置培養した。前培養したものから無菌的遠心分離により菌体のみを捕集し, 滅菌12.5%食塩水で2回洗浄し, この食塩水1mlに生菌数約 5×10^7 になるように懸濁させた。本培養培地調製にあたっては滅菌時におけるメイラード反応などの影響をさけるため, グルコース溶液とその他の成分溶液を別々に120℃で10分間高圧滅菌した。そして, 接種時1ℓの三角フラスコに酵母懸濁液と本培養培地が600mlになるように調整し混合した。なお, 酵母の接種菌数は600ml当り 3×10^8 とした。培養は30℃で1日, 3日, 5日, 7日, 10日の各期間, そして *T. versatilis* に関してはさらに15日間と20日間静置培養を行なった。

3. 香気の観察, 生育度およびpHの測定

各期間培養後, 培養にともなう揮発水分量を補充し, 香気(立ちばな)の観察を行なった。生育度はニルマ光電比色計を使用し, 660nmにおける吸光度(OD)で示した。ただしブランクとして無接種培地を用いた。pHは培養液について直接pHメーター(日立堀場製)で測定した。

4. 一般成分量の測定

培養液を3,500r.p.mで10分間遠心分離し, その上澄液についてグルコース量はフェノール—硫酸法¹³⁾, 全窒素量はケルダール法で測定した。また, 無接種培地のグルコース量と全窒素量を測定し, それをもとにグルコースおよび窒素の消費率を求めた。

5. 揮発性成分量の測定

揮発性成分の捕集は Yamanishi¹⁴⁾ らに準じて図1に示した装置を用いて培養液中の揮発性成分を水とともに蒸留して捕集した。

まず、左のフリーザーでメタノールを冷却し、それを循環ポンプでトラップAの槽へ送り、トラップAを冷却するとともにコンデンサーも冷却する。トラップBとCは右のフリーザーで -80°C まで冷却しておく。留液の調製は培養液200mlをpH2あるいはpH7に調整し図1のコルベンに入れ、10mmHg以下で培養液が乾固するまで減圧蒸留を行なった。さらに少量の蒸留水を用いて減圧蒸留を繰り返し、留液を合わせ250mlの定容とした。なお、留液はほとんどトラップAに捕集され、トラップBには少量の水結、トラップCには極めてわずかな水結が認められた。トラップBとCの水結を解凍後、留液をすべて合わせて分析に供した。

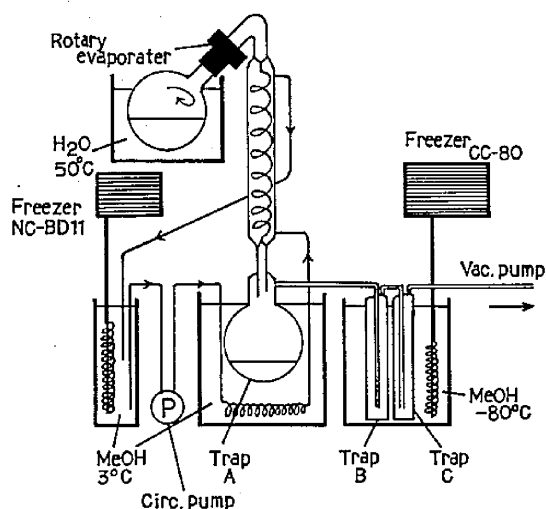


図1 揮発性成分分離捕集装置

総アルコールは $\text{Ce}(\text{NO}_3)_4 \cdot \text{NH}_4\text{NO}_3$ を用いる比色法¹⁵⁾で測定し ethanol として示し、フーゼル油はヴァニリン—硫酸法¹⁶⁾により 3-methylbutanol として求めた。総アルデヒドは 3-methyl-2-benzothiazolinehydrazone として比色法¹⁷⁾により測定し、ethanal として求めた。アセトアルデヒドも p-Hydroxybiphenyl を用いる比色法¹⁸⁾により定量した。揮発性有機酸はアルカリ滴定法で酢酸として求めた。

実験結果および考察

1. 香気の観察

S. rouxii と *T. versatilis* の培養液の香気を観察し、そのプロフィールを表2に示した。

S. rouxii と *T. versatilis* の香気を比較した場合、前者にはさわやかな、軽い清酒様香気と甘い果実様香気認められ、後者には重い感じの清酒様香気と弱い醬油様および漬物様の香気が認められた。両菌株とも培養期間の経過に伴い香気は強くなり、培養初期に観察されたさわやかさと軽い感じが減り重い感じの香気に変化した。また、培養後期にはエタノール様の刺激臭や自己消化様の臭気も観察された。なお、両菌株の留液についても香気を観察したところ、培養液を pH2 に調整し得られた留液の香気はほぼ培養液の香気を再現していたが、pH7 に調整し得られた留液からは土臭さやアルカリ臭が認められた。このことから耐塩性酵母の培養液の香気において酸性物質やエステル類の重要性が考えられる。

表2 培養液の香気のプロフィール

培養期間 (日)	<i>Saccharomyces rouxii</i> S84	<i>Torulopsis versatilis</i> D-5
0	培地臭 弱いカラメル様香気	培地臭 弱いカラメル様香気
1	さわやかな軽い清酒様香気 甘い果実様香気	培地臭 弱いカラメル様香気
3	清酒様香気	清酒様香気 弱い醤油様香気
5	清酒様香気 アルコール臭	清酒様香気 弱い醤油様香気
7	清酒様香気 アルコール臭 弱い自己消化様臭気	清酒様香気 アルコール臭
10	清酒様香気 アルコール臭 弱い自己消化様臭気	清酒様香気 アルコール臭
15		清酒様香気 アルコール臭 弱い漬物様、自己消化様臭気
20		清酒様香気 アルコール臭 弱い漬物様・自己消化様臭気

2. 生育曲線, グルコースおよび窒素の消費率の変化

S. rouxii と *T. versatilis* の生育曲線と培養経過に伴うグルコースおよび窒素の消費率の変化を図2に示した。

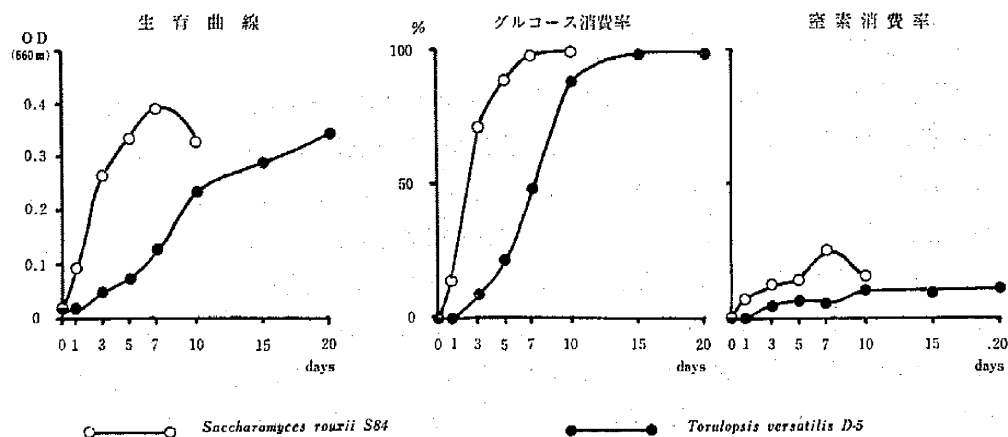


図2 培養経過にともなう生育曲線およびグルコースと窒素消費率の変化

この図の生育曲線からは *S. rouxii* の生育誘導期が認められないが、誘導期は非常に短いものと考えられる。*S. rouxii* の生育は1日～3日の生育が急速であり、7日を最高に10日目には減少した。

このことから7日以降に自己消化の進行があると考えた。一方、*T. versatilis* の生育は *S. rouxii* の生育に比べかなり遅く、*S. rouxii* の5日目の生育程度に達したのは20日目であった。また、*T. versatilis* には1日間の生育誘導期が認められ、対数期の生育も *S. rouxii* に比べゆるやかであったが、7日から10日にかけて比較的急速な生育が認められた。

両菌株の培養経過に伴うグルコースの消費率の変化はほとんど生育度の増加傾向に対応していた。すなわち、*S. rouxii* のグルコースの消費は7日まで急速に行なわれ、7日目に97.5%10日目には98.8%の消費率を示した。また、グルコースの40%近くは1日～3日の間に消費され、急速な生育が認められた期間に一致した。*T. versatilis* のグルコース消費も生育と同じく *S. rouxii* に比べかなり遅いことが認められた。7日目および10日目のグルコース消費率はそれぞれ48.5%、88.3%であり、グルコース消費率が98.5%に達するのは15日目であった。20日目のグルコース消費率は98.3%と15日目とほとんど変化なく、グルコースは15日間でほとんど消費しつくされたことが認められた。また、1日目まではほとんどグルコースの消費がないこととグルコース40%近くが7日から10日にかけて消費されたことは生育度の増加の傾向と一致した。一方、窒素の消費はグルコースの消費に比べ少なく、*S. rouxii* が7日目に消費率24.9%に達したのが最高値であった。*S. rouxii* の5日から7日にかけて比較的急速な窒素の消費が認められるものの両菌株とも徐々に窒素を消費した。窒素の消費傾向はおおむね生育曲線やグルコースの消費傾向に似ているが、対数期における急速な生育の増加やグルコースの消費に対応しての急速な窒素の消費は認められなかった。*S. rouxii* の10日目の残存窒素量は7日目のそれよりも多く、このことは前述の7日目以降に自己消化の進行があるとしたことを支持しているように考えられる。

3. 揮発性成分量の変化

前述のごとく、培養液を pH 2 で調整し得られた留液がほぼ培養液の香気を再現していたので、この留液について揮発性成分の定量を行ない、その変化を図3に示した。

1) 総アルコール及びフーゼル油

総アルコール及びフーゼル油の生成量の変化はほぼグルコースや窒素の消費の傾向に対応していた。すなわち、*S. rouxii* の総アルコール及びフーゼル油の生成は1日目より認められ、両成分は更に5日目まで急速に増加し、7日目には最高量に達した。7日目はグルコース消費率が97.5%とグルコースがほとんど消費しつくされた期間であり、且つ、窒素の消費率が最高に達した期間でもあった。グルコースの消費率は10日目まで更に1%近くのびるが総アルコール量は逆に少し減少した。これはグルコースからアルコール以外の成分への変換や培養期間中の香気の飛散などが考えられる。しかし、香気の飛散に関しては *S. rouxii* より培養期間の長い *T. versatilis* に両成分の減少がほとんど認められないことから検討を要する。また、10日目には窒素消費率が10%近くも低下するが、アミノ酸より生成されると考えられるフーゼル油の減少はわずかであった。*T. versatilis* の総アルコール及びフーゼル油の生成速度は *S. rouxii* に比べかなり遅く最高量に達したのは総アルコールが15日目、フーゼル油が20日目であり、これはグルコースや窒素の消費傾向に一致していた。また、量的には両

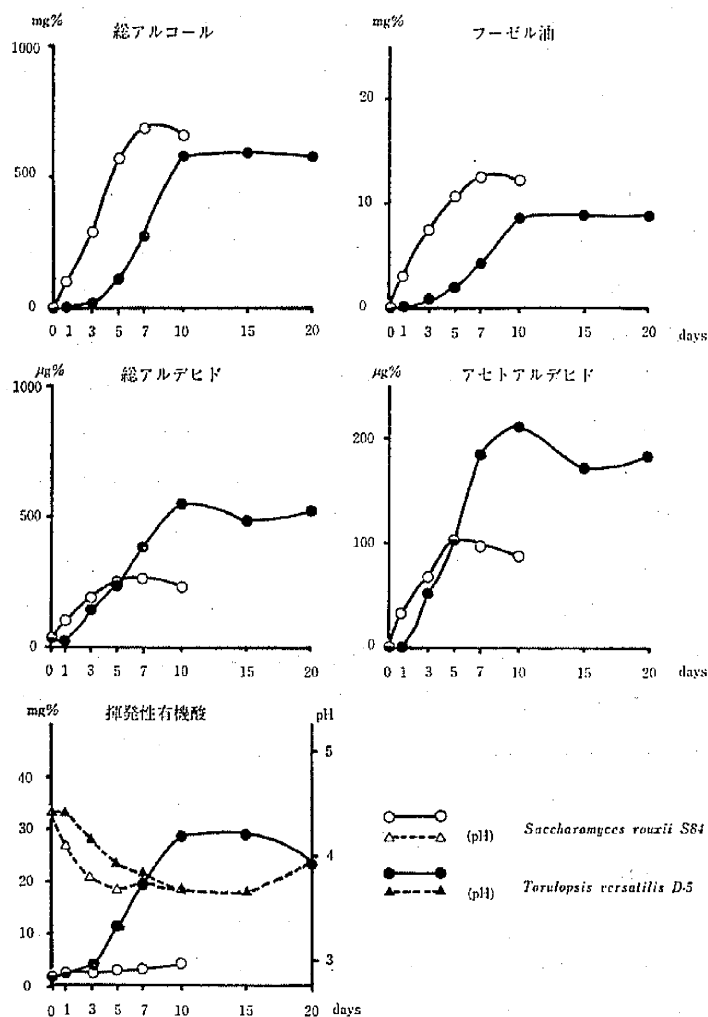


図3 培養経過にともなう揮発性成分の変化

成分とも *S. rouxii* の方が *T. versatilis* よりも少し多いことが認められた。最高値での総アルコール中のフーゼル油の占める割合は両菌株とも2%弱であった。

2) 総アルデヒド及びアセトアルデヒド

総アルデヒドとアセトアルデヒドの生成量はともに *T. versatilis* の方が *S. rouxii* よりかなり多く、最高値での比較ではほぼ2倍であることが認められた。これら両成分量の差が両菌株の香気の違いの一因になっていると考えられる。両成分の最高量に達する期間は *S. rouxii* が5日～7日、*T. versatilis* が10日目であり、これ以降わずかながら減少の傾向にあった。これら減少傾向はアルコール類に認められないことから飛散によるとは考えられず、アルコール類などへの変換が考えられる。また、これら最高量に達する期間はグルコースの消費率やアルコール類の生成量が最高に達する日より2日～5日間早いことが認められた。総アルデヒド中のアセトアルデヒドの占める割合を最高値で計算する

と、両菌株ともかなり大きく約89%であった。

3) 揮発性有機酸

T. versatilis の揮発性有機酸の生成量は *S. rouxii* のそれに比べかなり多く、最高値での比較ではほぼ10倍であることが認められ、アルデヒド類と同じく両菌株の香気の差の一因になっていると考えた。前述の香気に対する酸性物質の重要性からも *T. versatilis* の揮発性有機酸に関して更に詳細な検討を要すると考えられる。*T. versatilis* の揮発性有機酸量はグルコースの消費率が最高に達する15日目が最高値であった。また、20日目には揮発性有機酸量の減少が認められるが、生育度は逆に増加していることから、ほとんど消費しつくされたグルコースに代り炭素源として利用された可能性が考えられる。*T. versatilis* の培養液の pH 変化は揮発性有機酸の生成量に対応し、生成量が多くなれば pH も低下した。一方、*S. rouxii* の揮発性有機酸の生成量は *T. versatilis* に比べわずかであり、培養経過に伴う顕著な増加も認められなかった。また、pH の変化も揮発性有機酸の生成量の変化に対応しなかった。

以上の結果から、耐塩性酵母の生成する香気について研究を進めるにあたり、培養期間を設定する場合、炭素源がほぼ消費しつくされた期間にすることが、使用菌株に対し一律に規定するよりもより妥当のように考えられる。ただ、培養経過に伴う香気飛散の問題も検討しなければならないが、培養後期に著しい揮発性成分の減少が認められなかったことと実際の味噌の熟成容器が完全密閉でないことから、現時点においてあまり考慮する必要がないように考えられる。

要 約

耐塩性酵母の *Saccharomyces rouxii* S84 と *Torulopsis versatilis* D-5 の培養経過に伴う生育とグルコースおよび窒素の消費について調べ、更に香気の観察と揮発性成分量の変化について検討した。

1) *S. rouxii* は1日目から3日目にかけ急速に生育し、7日目に生育度が最高に達した。

T. versatilis は7日目から10日目にかけて比較的急速な生育が認められるものの、生育の速度は *S. rouxii* よりかなり遅く、20日目まで徐々に生育しつづけ、最終的には *S. rouxii* の生育度にはほぼ近づいた。グルコース及び窒素の消費率の変化はほとんど生育曲線に対応し、*S. rouxii* と *T. versatilis* のグルコース消費率はそれぞれ7日目と15日目に98%近くに達した。窒素の消費に関してはグルコースのように急速な消費は認められなかったが、生育の増加にほぼ対応していた。

2) 培養液の香気の観察の結果、*S. rouxii* にはさわやかな、軽い清酒様香気と甘い果実様香気が認められ、*T. versatilis* には重い感じの清酒様香気と弱い醤油様および漬物様の香気が認められた。両菌株とも培養期間に伴い香気が強くなり、次第に重い感じの香気に変化した。また、培養後期にはエタノール様の刺激臭や自己消化様の臭気も観察された。なお、培養液を pH 2 に調整し得られた留液の方が pH 7 で得られた留液よりも培養液の香気を再現していたので、酸性物質およびエステル類の培養液の香気に対する重要性を考察した。

3) 揮発性成分は培養液を pH 2 に調整し、減圧蒸留により水とともに補集した。定量を試みたの

のは総アルコール、フーゼル油、総アルデヒド、アセトアルデヒド及び揮発性有機酸で、これら成分量の培養経過に伴う変化はグルコースや窒素の消費傾向にほぼ対応していた。すなわちグルコースや窒素の消費率が最高に達した期間が揮発性成分量も最も多い傾向にあった。ただ、アルデヒド類は他の成分に比べ、やや早い期間で最高値に達した。

以上のことから、耐塩性酵母の生成する香気について研究を進めるにあたり、培養期間を設定する場合、炭素源がほぼ消費しつくされた期間にすることが、使用菌株に対し一律に規定するよりもより妥当と考察した。

本研究の遂行にあたり、実験に御協力いただいた本学の山田正子さんに深く感謝致します。

文 献

- 1) 本間伸夫：醸造協会誌，57，111（1962）
- 2) 本間伸夫，今井誠一：醸酸工学誌，43，18（1965）
- 3) 望月 務：醸酵工学誌，40，16（1962）
- 4) 望月 務：醸酵工学誌，40，21（1962）
- 5) 本間伸夫，今井誠一：醸酵工学誌，43，102（1965）
- 6) 安平仁美，望月 務：信州味噌研報告，10，19（1969）
- 7) 本間伸夫，石原和夫：醸酵工学誌，56，199（1978）
- 8) 安平仁美，武居正泰，大内一朗，望月 務：信州味噌研報告，9，25（1968）
- 9) 森 隆，木内 幹，海老根英雄：食品工業学会大会研究発表要旨集，P22（1980）
- 10) 松本伊左尾，今井誠一：食品工業学会誌，11，513（1973）
- 11) 今井誠一，松本伊左尾：醸造協会誌，70，413（1975）
- 12) 今井誠一，松本伊左尾：醸造協会誌，70，893（1975）
- 13) M. Dubois et al: *Anal. Chem.*, 28, 350 (1956)
- 14) Yamanishi, T., Nose, M., Nakatani, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, 34, 599 (1970)
- 15) 船久保英一：有機化合物確認法（I），149，養賢堂，東京（1967）
- 16) 日本分析化学会編：分析化学便覧，1452，丸善，東京（1971）
- 17) Sawicki, E., Hauser, T. R., Stanley, T. W., Elbert, W.: *Anal. Chem.*, 33, 93 (1961)
- 18) Dawes, E. A., McGill, D. J., Midgley, M.: *Methods in Microbiology*
(Norris, J. R., Ribbons, D. W.) Vol. VIA, 109, Academic Press, London・New York (1971)

（1983年1月17日受理）